こ の 添 付 文 書 を よ く 読 ん で か ら 使 用 し て く だ さ い 。
ま た 、 必 要 時 に 読 め る よ う に 保 管 し て お い て く だ さ い 。

体外診断用医薬品

** 2012 年 12 月改訂（第 3 版）
＊ 2010 年 3 月改訂（第 2 版）

製造販売承認番号：22100AMX00779000

チトクローム P450（CYP）ジェノタイプ解析キット

アンプリチップ® CYP450

＊【重要な基本的注意】

本キットは、薬物代謝酵素 Cytochrome P450（CYP）の2D6及び2C19 のジェノタイピングを行うものですが、そのすべてのアリルのタイピングを行えるものではありません。特に、14A、18、21 などに代表される、日本人の poor metabolizer の要因となり得るため臨床的に注意が必要な、いくつかのアリルは測定できません。上記のアリル以外にも、添付文書で本品により解析不可能とされているアリル、新たに報告されたアリル、現在までに報告されていない遺伝子多型が存在する検体の場合、正しく測定できない可能性があるので注意してください。

アンプリチップ CYP450 で解析可能なアリル

以下に示した CYP2D6及び CYP2C19 アリルについて、本品で解析可能です。

CYP2D6：1、2ABD、3、4ABDJK、5、6ABC、7、8、9、10AB、11、15、17、19、20、29、35、36、40、41、1XN、2XN、4XN、10XN、17XN、35XN、41XN

CYP2C19：1、2、3

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて、担当医師が総合的に判断してください。
3. 添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。また、試薬ごとに設定された反応時間及び温度などは厳守してください。
5. 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
6. キットの試薬を取り扱う際には保護用眼鏡、実験着及び使い捨てゴム手袋を着用し、試薬が皮膚、目、粘膜などに触れないように注意してください。万が一、このようなことが起きた場合は、大量の水でじゅうぶんに洗い流し、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。

【形状・構造等(キットの構成)】

アンプリチップ CYP450

1. アンプリチップ CYP450 マスターミックス〔CYP450 MMX〕　1×1.3 mL
   2’-デオキシアデノシン-5’-三リン酸（dATP）
   2’-デオキシシチジン-5’-三リン酸（dCTP）
   2’-デオキシグアノシン-5’-三リン酸（dGTP）
   2’-デオキシチミジン-5’-三リン酸（dTTP）
   2’-デオキシウリジン-5’-三リン酸（dUTP）
   AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ
   CS5 Gold DNA ポリメラーゼ
2. アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A〔CYP450 PM-A〕　1×0.7 mL
   プライマー-MN431
   プライマー-D12R
   プライマー-NP162
   プライマー-WK621
   プライマー-WK418CC
   プライマー-NP158
3. アンプリチップ CYP450 プライマーミックス B〔CYP450 PM-B〕　1×0.7 mL
   プライマー-WK404
   プライマー-WK405
   プライマー-NP164
   プライマー-NP165
4. アンプリチップ マグネシウム試液〔Mg^{2+}〕　1×1.3 mL
5. アンプリチップ TdT 標識試液〔TdT〕　1×25μL
6. アンプリチップ B1 オリゴヌクレオチド試液〔B1 Oligo〕　1×1.3 mL
7. アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕　24 個
   CYP450 用 DNA プローブ固相マイクロアレイ
8. アンプリチップ CYP450 陽性コントロール〔CYP450 (+)C〕　1×20μL
9. アンプリチップ 陰性コントロール〔A-CHIP (-)C〕　1×1.2 mL

＊【使用目的】

全血中の薬物代謝酵素CYP2D6（1、2ABD、3、4ABDJK、5、6ABC、7、8、9、10AB、11、15、17、19、20、29、35、36、40、41、1XN、2XN、4XN、10XN、17XN、35XN、41XN）及びCYP2C19（1、2、3）のジェノタイプの解析（薬物代謝酵素活性の予測の補助）

【測定原理】

1. 測定法

本キットは全血検体から抽出したゲノム DNA を用いて、薬物代謝酵素 CYP2D6及び CYP2C19 のジェノタイプの解析を、以下のステップにより行います。

（1） PCR による増幅

PCR（Polymerase Chain Reaction）法により、ゲノム DNA 中の CYP2D6及び CYP2C19 遺伝子をアンプリチップ CYP450 マスターミックスと、アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A 及びアンプリチップ CYP450 プライマーミックス B をそれぞれ用いて増幅します。アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A を用いた PCR 反応により、検体又はコントロール中の CYP2D6遺伝子のプロモーター領域及びコーディング領域を含む増幅産物と、CYP2D6遺伝子重複が起こっている場合に特異的な増幅産物が生成します。アンプリチップ CYP450 プライマーミックス B を用いた PCR 反応により、検体又はコントロール中の CYP2C19 遺伝子のエクソン4及び5を含む増幅産物と、CYP2D6遺伝子欠損が起こっている場合に特異的な増幅産物が生成します。まず、高温で検体中のゲノム DNA を1本鎖に変性させるとともに、DNA ポリメラーゼ（AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ及び CS5 Gold DNA ポリメラーゼ）を活性化させます。次に温度を下げると、プライマー（アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A 中のプライマー-MN431、プライマー-D12R、プライマー-NP162、プライマー-WK621、プライマー-WK418CC 及びプライマー-NP158、アンプリチップ CYP450 プライマーミックス B 中のプライマー-WK404、プライマー-WK405、プライマー-NP164 及びプライマー-NP165）をそれぞれ標的配列にアニールし、Mg^{2+}及び過剰なデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）である 2’-デオキシアデノシン-三リン酸（dATP）、2’-デオキシシ

チジン-三リン酸(dCTP)、2'-デオキシグアノシン-三リン酸(dGTP)、2'-デオキシチミジン-三リン酸(dTTP)及び2'-デオキシウリジン-三リン酸(dUTP)の存在下、DNA ポリメラーゼの働きにより標的配列に相補的なDNA鎖が伸長されます。この「熱変性」、「プライマーのアニーリング」、「DNA ポリメラーゼによる相補鎖の伸長」を35サイクル繰り返すことで、増幅産物が生成されます。

(2) 増幅産物の断片化及び標識

アンプリチップ CYP450 プライマーミックスA及びアンプリチップ CYP450 プライマーミックスBを用いてそれぞれ得た増幅産物をプールし、調製済み断片化ミックスを用いて増幅産物の断片化を行います。まず、DNase Iの働きにより平均サイズ50～200ヌクレオチドのDNAフラグメントを得ます。なお、断片化した増幅産物のサイズ(50～200 ヌクレオチド)はゲル電気泳動により確認されています。続いて、調製済み断片化ミックス中のアルカリフォスファターゼの働きにより、増幅反応における残留デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を取り除きます。更に、断片化したDNA増幅産物の3'末端に、ターミナルトランスフェラーゼの働きにより、アンプリチップ TdT 標識試液中のビオチンを標識します。

(3) アンプリチップ CYP450 マイクロアレイへのハイブリダイゼーション及び蛍光染色

ビオチン標識した CYP450 標的 DNA フラグメントを、ハイブリダイゼーションコントロールであるアンプリチップ B1 オリゴヌクレオチド試液を含むハイブリダイゼーション緩衝液に加えます。この混合液を、GeneChip Fluidics Station 450Dx(Affymetrix 社)を用いてアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ中のCYP450用DNAプローブ固相マイクロアレイ上の DNA プローブにハイブリダイズさせます。ハイブリダイズしたアンプリチップ CYP450 マイクロアレイを洗浄し、蛍光(R-フィコエリスリン)標識ストレプトアビジンコンジュゲートを結合させます。アンプリチップ CYP450 マイクロアレイは、フォトリソグラフィー法とコンビナトリアルケミストリーを合わせた技術により製造し[1), 2)]、増幅した標的DNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方を解析するため15,000以上の異なるオリゴヌクレオチドプローブがガラス表面上に合成されています。20μm 四方のプローブマイクロアレイのプローブセルと呼ばれる特異エリアにプローブの種類ごとに約10^6～10^7 コピーのプローブが固相されています。アンプリチップ CYP450 マイクロアレイには各多型を正確に解析するために約240のプローブが用いられています。プローブマイクロアレイは Light-Directed コンビナトリアルケミストリーを複数回繰り返して製造します。ガラス基盤に感光性保護基を含むリンカーを付加した後、マスクをセットしてプローブマイクロアレイの選択した位置を暴露させます。光を照射すると、マスキングしていない位置の感光性保護基が脱保護され、選択したヌクレオシドへのホスホラミダイト付加が行われます。次に、別のマスクがセットされ、照射と化学カップリングが再び行われます。これを繰り返すことにより、特定の位置に必要な種類のオリゴヌクレオチドプローブのセットが合成されます。完成したプローブマイクロアレイはGeneChip Fluidics Station 450 Dx用のカートリッジにパッケージされます。

(4) アンプリチップ CYP450 マイクロアレイのスキャニング

蛍光染色後、アンプリチップ CYP450 マイクロアレイのプローブにハイブリダイズしたCYP450 標的DNA断片と結合した蛍光物質をGeneChip Scanner 3000Dx(Affymetrix 社)を用い、レーザー光で励起してスキャンします。発光量はプローブマイクロアレイの各位置に結合した標的DNA量に比例します。約15,000のプローブセルのイメージがそれぞれデータファイルに記録され、データ解析に使用されます。

(5) ジェノタイプと予測されるフェノタイプの決定

GeneChip Operating Software(GCOS v1.1.3 以上)と AmpliChip CYP450_US Data Analysis Software v 2.1、又は、Affymetrix Molecular Diagnostic Software(AMDS v1.0 以上)と AmpliChip CYP450 Data Analaysis Software v3.1を用いてデータ解析を次のステップにより行います。

① GeneChip Operating Software が自動的に、スキャンしたマイクロアレイのイメージにグリッドをつけて個々のプローブセルを区別し、各プローブセルの平均蛍光強度を算出します。

② AmpliChip CYP450_US Data Analysis Software は CYP450 用のアルゴリズムを用いて蛍光強度のパターンを分析し、プローブマイクロアレイ上の変異型及び野生型を標的とした相補的な配列のプローブにハイブリダイズした相対的な程度を分析し、それぞれに特異的である多型の位置からジェノタイプを解析します。

③ AmpliChip CYP450_US Data Analysis Softwareのアルゴリズムは29の特異的な多型のジェノタイプ(野生型、変異型、ヘテロ接合型)を解析し、判明しているアリルのジェノタイプパターンの組み合わせ情報と比較して、測定した DNA のアリルと一致するものを決定します。結果にはジェノタイプの要約と解析されたアリルと多型のリストが報告されます。ジェノタイプの解析結果を用い、発表された研究に基づいて予測されるCYP2D6及びCYP2C19 酵素活性が示されます[3)]。

2. キャリーオーバーコンタミネーションの防止

本キットでは、以下の方法により増幅されたDNA産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止しています。DNA合成に必要な基質の一つであるdTTPの代わりにdUTPを用いて増幅反応を行うため、増幅されたDNA の塩基配列はチミン(T)がウラシル(U)に全て置き換わっています。また、この系で増幅された DNA が新たに試験する試料中へ混入した場合、マスターミックスに含まれているウラシル N-グリコシラーゼ(UNG)が作用し DNA中の U 塩基は除去されます。塩基を失った DNA は構造上極めて不安定な分子であり、増幅反応の最初の加熱によりリン酸結合が切断され、新たな増幅の鋳型とはなり得ません。UNG は高温で失活するため、それ以後に増幅されてくるU塩基を含む増幅DNAは影響を受けません。また、UNGは6塩基以上のDNA上のウラシルのみに反応し、モノマーの dUTP や RNA 上のウラシルには作用しません[4)]。

**【操作上の注意】

1. コンタミネーションの防止法

本キットのアンプリチップ CYP450 マスターミックスにはウラシル N-グリコシラーゼ(UNG)が添加されており、また DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて PCR を行うため、本キットにて増幅されたDNA のキャリーオーバーコンタミネーションによる誤差を防止することはできますが、検体間で発生するクロスコンタミネーションを防止することはできません。クロスコンタミネーションは、主に検体を扱ったピペットなどで発生するエアロゾルやピペット本体の汚染が原因となるので、検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃などを徹底することで、クロスコンタミネーションの発生を最小限に防止することができます。

2. 測定試料の性質、採取法

測定試料には全血を用います。全血は EDTA 入り採血管に採取します。全血の保管は室内温度で7日以内です。また、2～8℃で1ヵ月間、－20℃保存で7週間保存できます。凍結融解は5回まで可能です。2～8℃又は－20℃保存した検体を使用する際は、室内温度にじゅうぶん戻してから使用してください。

3. 妨害物質･妨害薬剤

脂質、ビリルビン及びヒト血清アルブミンによる影響を検討するため、各妨害物質について、正常値の約 10 倍の濃度の妨害物質をそれぞれ添加した検体と添加していない検体を 10 検体調製して本品で測定したところ、以下の濃度まで測定への影響は認められませんでした。

アルブミン	6,000 mg/dL
ビリルビン	60 mg/dL
トリグリセライド	3,000 mg/dL

4. 反応特異性

本品2ロットを用い、CYP2D6及び CYP2C19 のジェノタイプが判っている 390 例の全血検体から抽出したゲノム DNA と、32 例のプラスミド DNA クローンの混合試料について、RFLP 法(Restriction Fragment Lenghth Polymorphism、制限酵素断片長多型測定)、AS-PCR 法(Allele Specific PCR)及び DNA 塩基配列決定法を含む他の測定方法による結果と本品での測定結果を用いて、アリル毎の解析率を求めたところ、CYP2D6遺伝子は99.2%、CYP2C19 遺伝子は 100%でした(表1、2)。

表1 CYP2D6アリルの解析

アリル	試験数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	解析率	クローン試料の使用
*1	231	230	0	1	99.6%	無
*2	109	108	0	1	99.1%	無
*3	13	13	0	0	100.0%	無
*4	129	129	0	0	100.0%	無
*5	39	39	0	0	100.0%	無
*6	11	11	0	0	100.0%	無
*7	3	3	0	0	100.0%	有
*8	4	4	0	0	100.0%	有
*9	12	12	0	0	100.0%	3試験分使用
*10	63	61	0	2	96.8%	無
*11	3	3	0	0	100.0%	有
*14	5	5	0	0	100.0%	4試験分使用
*15	3	3	0	0	100.0%	有
*17	35	35	0	0	100.0%	無
*19	3	3	0	0	100.0%	有
*20	4	4	0	0	100.0%	有
*25	3	3	0	0	100.0%	有
*26	3	3	0	0	100.0%	有
*29	12	12	0	0	100.0%	無
*30	4	3	1	0	75.0%	3試験分使用
*31	3	3	0	0	100.0%	有
*35	34	34	0	0	100.0%	無
*36	5	5	0	0	100.0%	3試験分使用
*40	1	1	0	0	100.0%	無
*41	76	76	0	0	100.0%	無
*1XN	16	15	0	1	93.8%	無
*2XN	7	6	0	1	85.7%	無
*4XN	4	4	0	0	100.0%	無
*10XN	6	6	0	0	100.0%	無
*17XN	1	1	0	0	100.0%	有
*35XN	1	1	0	0	100.0%	有
*41XN	1	1	0	0	100.0%	有
合計	844	837	1	6	99.2%	

表2 CYP2C19 アリルの解析

アリル	試験数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	解析率	クローン試料の使用
*1	628	628	0	0	100.0%	無
*2	202	202	0	0	100.0%	32 試験分使用
*3	14	14	0	0	100.0%	無
合計	844	844	0	0	100.0%	

また、ジェノタイプごとの解析を行ったところ、CYP2D 遺伝子の Genotype Accuracy(分析感度)は 99.1%、Genotype Call Rate(Correct Call 数とMiscall 数の割合)は 99.3%であり、CYP2C19 遺伝子はGenotype Accuracy、Genotype Call Rate とも 100%でした。(表3、4)を行いました。

表3 ゲノム DNA 試料を用いた CYP2D6ジェノタイプの解析

CYP2D6 ジェノタイプ	試料数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	Genotype Accuracy	Genotype Call Rate
*1/*1	31	31	0	0	100.0%	100.0%
*1/*1XN	5	5	0	0	100.0%	100.0%
*1/*2A	30	30	0	0	100.0%	100.0%
*1/*2AXN	2	1	0	1	50.0%	50.0%
*1/*2D	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*2DXN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*3	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*1/*4A	30	30	0	0	100.0%	100.0%
*1/*4AXN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*4D	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*4DXN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*5	15	15	0	0	100.0%	100.0%
*1/*6B	3	3	0	0	100.0%	100.0%
*1/*9	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*1/*10B	16	16	0	0	100.0%	100.0%
*1/*10BXN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*17	13	13	0	0	100.0%	100.0%
*1/*17XN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*29	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*1/*35	13	13	0	0	100.0%	100.0%
*1/*35XN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*40	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1/*41	14	14	0	0	100.0%	100.0%
*1XN/*2A	3	2	0	1	66.7%	66.7%
*1XN/*4A	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*1XN/*10A	1	1	0	0	100.0%	100.0%

CYP2D6 ジェノタイプ	試料数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	Genotype Accuracy	Genotype Call Rate
*1XN/*35	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*1XN/*41	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*2A	16	16	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*3	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*4A	20	20	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*5	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*6B	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*9	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*10B	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*35	8	8	0	0	100.0%	100.0%
*2A/*41	5	5	0	0	100.0%	100.0%
*2AXN/*17	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*2AXN/*41	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*3/*3	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*3/*4A	3	3	0	0	100.0%	100.0%
*3/*5	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*3/*35	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*3/*41	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*4A	23	23	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*4D	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*5	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*6B	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*9	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*15	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*35	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*4A/*41	11	11	0	0	100.0%	100.0%
*4D/*5	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*4D/*41	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*4DXN/*5	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*4DXN/*17	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*5/*5	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*5/*9	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*5/*10B	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*5/*10BXN	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*5/*17	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*5/*29	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*5/*35	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*5/*41	7	7	0	0	100.0%	100.0%
*6B/*41	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*9/*17	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*9/*41	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*10B/*10B	17	16	0	1	94.1%	94.1%
*10B/*10BXN	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*10B/*17	2	2	0	0	100.0%	100.0%

CYP2D6 ジェノタイプ	試料数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	Genotype Accuracy	Genotype Call Rate
*10B/*35	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*10B/*36	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*10B/*40	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*10B/*41	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*10BXN/*41	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*17/*17	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*17/*29	2	2	0	0	100.0%	100.0%
*17/*41	3	3	0	0	100.0%	100.0%
*29/*29	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*29/*36	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*29/*41	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*35/*35	1	1	0	0	100.0%	100.0%
*35/*41	4	4	0	0	100.0%	100.0%
*41/*41	9	9	0	0	100.0%	100.0%
*41/*41XN	1	1	0	0	100.0%	100.0%
合計	403	400	0	3	99.3%	99.3%

表4 CYP2C19 ジェノタイプの解析

CYP2C19 ジェノタイプ	試料数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	Genotype Accuracy	Genotype Call Rate
*1/*1	270	270	0	0	100.0%	100.0%
*1/*2	101	101	0	0	100.0%	100.0%
*1/*3	6	6	0	0	100.0%	100.0%
*2/*2	15	14	1	0	93.3%	93.3%
*2/*3	6	6	0	0	100.0%	100.0%
*3/*3	1	1	0	0	100.0%	100.0%
合計	399	398	1	0	99.7%	99.7%

5. その他

本キットの測定には専用機器『Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700』、『GeneChip Fluidics Station 450Dx』、『GeneChip Scanner 3000Dx』を用いてください。

【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬の調製方法

(1) 調製済みマスターミックス A 及び B

アンプリチップ CYP450 マスターミックス〔CYP450 MMX〕、アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A〔CYP450 PM-A〕、アンプリチップ CYP450 プライマーミックス B〔CYP450 PM-B〕及びアンプリチップ マグネシウム試液〔Mg^{2+}〕は常温で15分間放置し、10～15回転倒混和します。2.0 mLチューブを2本用意し、それぞれA、B とします。増幅する検体及びコントロール数に応じて、以下の各試薬を各容量ずつ加え、調製済みマスターミックス A 及び B を調製します。キャップを閉め、10～15 回転倒混和する。24 試料より少ない試料を増幅する場合、以下の1テスト用の容量とテスト数を掛けあわせ、更にこれに 1.05 をかけた容量の調製済みマスターミックス A 及び B を調製します。調製済みマスターミックス A 及び B は調製後 1 時間以内に使用してください。

構成試薬	24 テスト用	1テスト用
CYP450 MMX	630μL	25μL
CYP450 PM-A 又は CYP450 PM-B	630μL	25μL
Mg^{2+}	630μL	25μL

(2) 調製済み断片化ミックス

調製済み断片化ミックスは使用直前に調製してください。調製済み断片化ミックスを含むチューブは調製及び使用する間、常に氷冷しておいてください。未使用の調製済み断片化ミックスは廃棄してください。

① 20 mmol/L EDTA 溶液を調製する。0.5 mol/L EDTA 1 mL を脱イオン水 24 mL に加えてよく混和します。20 mmol/L EDTA 溶液は、清浄な密閉プラスチック容器に2～8℃保存で調製後6ヵ月まで安定です。

② 各試薬を以下の表の順にしたがって各容量ずつ加え、調製済み断片化ミックスを 2.0 mL チューブを用いて氷冷しながら調製します。

③ 調製済み断片化ミックスを軽く混和します。

24 テストより少ない数を断片化する場合、残った調製済み断片化ミックスは廃棄してください。DNase Ⅰ、アルカリフォスファターゼ及びターミナルトランスフェラーゼ(リコンビナント)は Roche Applied Science 社製のものを用いてください。DNase Ⅰの酵素活性単位は各社で異なっています。Roche Applied Science 社は *Kunits*[5]の方法にしたがって酵素活性の単位を定義しています。

試薬	24 テスト用	最終濃度
精製水(ヌクレアーゼフリー)	191.4μL	
20 mmol/L EDTA 溶液	3.3μL	0.3 mmol/L
アルカリフォスファターゼ(1 U/μL)	22μL	0.1 U/μL
Dnase Ⅰ(10 U/μL)	3.3μL	0.15 U/μL
計	220μL	

(3) 調製済み標識用ミックス

調製済み標識用ミックスは使用直前に調製すること。調製済み標識用ミックスを含むチューブは調製及び使用する間、常に氷冷してください。未使用の調製済み標識用ミックスは廃棄してください。

① 標識するテスト数に応じて、以下の各試薬を各容量ずつ加え、調製済み標識用ミックスを 2.0 mL チューブを用いて氷冷しながら調製します。24 試料より少ない試料を標識する場合、以下の1テスト用の容量とテスト数を掛けあわせ、更にこれに 1.1 をかけた容量の調製済み標識用ミックスを調製します。

② 調製済み標識用ミックスを軽く混和します。

試薬	24 テスト用	1テスト分
5× Terminal Transferase Reaction Buffer	187μL	6.8μL
25 mmol/L $CoCl_2$	22μL	0.8μL
アンプリチップ TdT 標識試液〔TdT〕	22μL	0.8μL
ターミナルトランスフェラーゼ(リコンビナント)(400 U/μL)	44μL	1.6μL
計	275μL	10μL

(4) ハイブリダイゼーション緩衝液

① 10% Triton X-100 溶液を調製します。清潔なボトルに Triton X-100 10 mL を分注し、精製水 90 mL を加え、よく混和します。10% Triton X-100 溶液は調製後 15～30℃保存(遮光)で6ヵ月間安定です。

② ハイブリダイゼーション緩衝液を以下の表にしたがって 15 mL チューブに調製し、10～15 回転倒混和します。ハイブリダイゼーション緩衝液は2～8℃保存で6ヵ月間安定です。

試薬	24 テスト用	最終濃度
20× SSPE Buffer	3.125 mL	5×
10% Triton X-100 溶液	62.5μL	0.05%
アンプリチップ B1 オリゴヌクレオチド試液〔B1 Oligo〕	1.25 mL	1:10 B1 Oligo
50× Denhardt's solution	250μL	1×
5% アジ化ナトリウム	225μL	0.09%
精製水	7.588 mL	
計	12.5 mL	

(5) 染色試液

染色試液を以下の表にしたがって調製し、10～15 回転倒混和します。ストレプトアビジン-R-フィコエリスリンコンジュゲート(1 mg/mL)は遮光して取り扱ってください。染色試液は2～8℃保存(遮光)で6ヵ月間安定です。

試薬	24 テスト用	最終濃度
20X SSPE Buffer	3.5 mL	5.6×
Acetylated bovine serum albumin(20 mg/mL)	625μL	1 mg/mL
ストレプトアビジン-R-フィコエリスリンコンジュゲート(1 mg/mL)	125μL	0.01 mg/mL
5% アジ化ナトリウム	225μL	0.09%
精製水	8.025 mL	
計	12.5 mL	

(6) 洗浄液

洗浄液を以下の表にしたがって15 mL チューブに調製し、ゆっくりと混和します。洗浄液は15～30℃保存で6ヵ月間安定です。

試薬	24 テスト用	最終濃度
20X SSPE Buffer	300 mL	3×
10% Triton X-100 溶液	1.0 mL	0.005%
5% アジ化ナトリウム	36 mL	0.09%
精製水	1,663 mL	
計	2,000 mL	

2. 別途必要な器具・器材・試薬

［ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社より供給］

- AmpliChip CYP450_US Data Analysis Softwawre（CD-ROM）v2.1 以上（GCOS v1.1.3 以上用）
- AmpliChip CYP450 Test Data Analysis Softwawre（CD-ROM）v3.1（AMDS v1.0 以上用）
- DNase Ⅰ（RNase-free）
- アルカリフォスファターゼ（ウシ腸由来）
- ターミナルトランスフェラーゼ（リコンビナント）（5× Terminal Transferase Reaction Buffer、と $CoCl_2$ solution を含む）
- ストレプトアビジン-R-フィコエリスリンコンジュゲート（1 mg/mL）

［その他］

機器

- Gold 96-well GeneAmp PCR Systems 9700 及び付属品（Applied Biosystems 社）
- GeneChip Fluidics Station 450Dx v.1（GCOS 用）又は v.2 以上（AMDS 用）（Affymetrix 社）
- GeneChip Scanner 3000Dx v.1（GCOS 用）又は v.2（AMDS 用）（Affymetrix 社）
- Data Station for the GCOS with GCOS software v1.1.3 以上又は Data Station with AMDS v1.0 以上（Affymetrix 社）

試薬（推奨品）

- ゲノム DNA 調製キット：QIAamp DNA Blood Mini Kit 又は QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit（QIAGEN 社）
- 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）（Invitrogen Corp.社）又は同等品
- 精製水
- 精製水（分子生物学用グレード、ヌクレアーゼフリー）
- AccuGENE 20X SSPE Buffer（3 mol/L NaCl、0.2 mol/L NaH_2PO_4、0.02 mol/L EDTA）（Cambrex 社）又は同等品
- Triton X-100 surfactant（Sigma-Aldrich 社）
- Denhardt's solution, 50× concentrate（Sigma-Aldrich 社）
- Sodium azide solution, 5%(w/v)（VWR International Mississauga 社）
- Acetylated bovine serum albumin, 20 mg/mL（Sigma-Aldrich 社）

消耗品（推奨品）

- For Applied Biosystems 96-Well GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler、及び MicroAmp(0.2 mL) Reaction Tubes (0.2 mL), Reaction Tubes, Caps, Tay/Retainers 又は MicroAmp Reation Tubes/Tray/Retainer Assembly and Base 又は Optical 96 well Reaction Tube
- Tough-Spots label, small（USA Scientific, Inc.社）又は同等品
- 2.0 mL screw cap tubes（Sarstedt 社）又は同等品
- 1.5 mL microfuge tubes（VWR 社）又は同等品
- Sterile polypropylene conical tubes, 15 mL（Corning 社）又は同等品
- 500 mL square media bottles: Nalgene

その他（推奨品）

- マイクロピペット及びチップ（チップは疎水性フィルター付き、ヌクレアーゼフリー）
- ヒートブロック式インキュベーター（95℃を維持できるもの）
- プラスチック製 Resealable bag
- 使い捨て滅菌済みピペット（5 mL 用、10 mL 用）
- 目盛付き容器
- 試験管ミキサー
- チューブ用ラック
- 使い捨て手袋（パウダーなし）
- 氷水浴
- アルミホイル

3. 操作法

本キットは 24 テスト分の構成試薬を含みます。 本キットの測定は1日又は2日間で行うことができます。1日で測定を行う場合は以下の(1)～(8)の順に操作を行います。2日間に渡って測定を行う場合、1日目は以下の(3)増幅又は(4)増幅産物の断片化及び標識までの操作を行います。

- 1日目に（3）までを行う場合：1日目に以下の(1)の①～（3）の④までの操作を行った後、増幅産物を－20℃保存します。2日目は(4)の①以降の操作を行います。
- 1日目に(4)までを行う場合：1日目に以下の(1)の①～(4)の⑪までの操作を行った後、標識及び断片化した増幅産物を－20℃保存します。2日目は(5)の①以降の操作を行います。
- アンプリチップ 陰性コントロール及び CYP450〔A-CHIP (-)C〕及びアンプリチップ CYP450 陽性コントロール〔CYP450 (+)C〕は、測定ごと又は 24 テストごとに1テストずつ測定してください。

(1) 検体及びコントロールの調製

① 各 DNA 調製キットの製造元プロトコールにしたがって、ゲノム DNA を抽出・精製します。DNA 濃度は 50～500 ng/PCR、A_{260}/A_{280} 比は 1.50～1.85 としてください。DNA を希釈する必要がある場合は、10 mmol/L Tris-HCl、0.1 mmol/L EDTA、0.09% アジ化ナトリウム、pH 8.0 の溶液で希釈します。未希釈又は希釈した検体 DNA は2～8℃で1週間又は－20℃で1ヵ月間保存可能です。凍結融解は3回まで可能です。

② 10 倍希釈アンプリチップ CYP450 陽性コントロールを、アンプリチップ 陰性コントロールを希釈液として用いて調製します。2.0 mL スクリューキャップ付きチューブにアンプリチップ陰性コントロール〔A-CHIP (-)C〕 54μL とアンプリチップ CYP450 陽性コントロール〔CYP450 (+)C〕 6μL を分注します。キャップを閉め、5秒間混和します（以降、「調製済み CYP450 陽性コントロール」）。

(2) 試薬の準備

Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 は使用する少なくとも 15 分前にスイッチを入れておきます。アンプリチップ CYP450 では、CYP2D6 及び CYP2C19 遺伝子の増幅は2つの別々の反応を行い、これをプールしたものを断片化、標識及びハイブリダイゼーションに用います。アンプリチップ CYP450 では、各検体及びコントロールについて、それぞれ2つの増幅反応が必要です。

① MicroAmp tray に 96 本チューブ（又は Reaction Tube）をセットし、Retainer と共に決まった位置に固定します。テスト数に係らず必ず 96 本チューブをセットします。

② 1.試薬の調製方法 (1)にしたがって調製済みマスターミックス A 及び B を調製します。

③ 検体又はコントロール用に使用する以外のチューブ全てに精製水を 100μL 分注します。

④ 調製済みマスターミックス A 75μL を検体及びコントロール用のチューブに分注します。

⑤ 調製済みマスターミックス B 75μL を検体及びコントロール用のチューブに分注します。

⑥ 調製済みマスターミックス A 及び B の入ったトレイを Resealable plastic bag に入れ、使用するまでチャックをします。調製済みマスターミックス A 及び B は常温で1時間まで安定です。

⑦ 調製済み検体、調製済み CYP450 陽性コントロール及びアンプリチップ 陰性コントロール各 25μL を調製済みマスターミックス A の入ったチューブに分注し、キャップを閉める。フィルター付きチップは検体及びコントロールごとに新しいものを用いてください。

⑧ 調製済み検体、調製済み CYP450 陽性コントロール及びアンプリチップ 陰性コントロール各 25μL を調製済みマスターミックス B の入ったチューブに分注し、キャップを閉めます。フィルター付きチップは検体及びコントロールごとに新しいものを用いてください。調製済み検体及びコントロールを調製済みマスターミックス A 及び B に分注したら、15 分以内に増幅を開始してください。

⑨ 残った調製済み検体は2～8℃で1週間又は－20℃で1ヵ月間まで保存可能です。凍結融解は3回まで可能です。

(3) 増幅

① Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700をアンプリチップ CYP450 用として以下のとおりプログラムします。
プリサイクル　50℃で2分間
プリサイクル　95℃で 10 分間
サイクル 1～35　95℃で 20 秒間、67℃で4分間
ポストサイクル　72℃で7分間
ポストサイクル　4℃でホールド
ユーザー名と Method 名を入力する。Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 の取扱説明書をご参照ください。

② トレイと Retainer をサーマルサイクラーにセットし、全てのチューブがしっかりとキャップされていることを確認します。

③ METHOD プログラムを開始します。"Method Options"画面で"Ramp Speed"を"Max"、"Reaction Volume"を"100μL"にセットします。START を再度押します。プログラム終了まで約3時間 30 分を要します。

④ 72℃のポストサイクルを含む増幅が終了したら、トレイをサーマルサイクラーから取り出し、MicroAmp Base に置きます。必要な場合は、チューブは増幅終了後、サーマルサイクラー内に4℃で 18 時間まで置いておくことができます。サーマルサイクラーからチューブを取り出してから 30 分以内に増幅産物の断片化を行わない場合は、増幅トレイを－20℃保存してください。

(4) 増幅産物の断片化及び標識

① 1.試薬の調製方法 (2)にしたがって調製済み断片化ミックスを使用直前に調製し、氷冷してください。

② 新しいトレイと Retainer を用意し、必要な反応チューブをトレイにセットし(1 検体又はコントロールにつき1チューブが必要)、断片化用トレイを Retainer で固定します。増幅産物を－20℃保存した場合、常温で完全に融解してから使用してください。

③ 調製済みマスターミックス A のチューブのキャップを開けます。増幅産物のエアロゾルが発生しないよう、慎重に開けてください。ピペッティングを3回繰り返して増幅産物をゆっくり混和し、トレイのチューブに増幅産物8μL を分注します。

④ 調製済みマスターミックス B のキャップを開けます。増幅産物のエアロゾルが発生しないよう、慎重に開けます。ピペッティングを3回繰り返して増幅産物をゆっくり混和し、断片化用トレイの調製済みマスターミックス A の増幅産物が分注されたチューブに調製済みマスターミックス B の増幅産物8μL を分注します。

⑤ 調製済み断片化ミックス8μL を各チューブに加えます。ピペッティングを3回繰り返して増幅産物をゆっくり混和し、キャップを閉めます。

⑥ 直ちに断片化用トレイ／Retainer を以下のとおりプログラムされた Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 にセットします。
プリサイクル　25℃で 20 分間
プリサイクル　95℃で 10 分間
プリサイクル　4℃でホールド
ユーザー名と Method 名を入力します。Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 の取扱説明書をご参照ください。METHOD プログラムを開始します。"Method Options"画面で"Ramp Speed"を"Max"、"Reaction Volume"を"24μL"にセットします。START を再度押します。プログラム終了まで約 40 分を要します。
この反応における反応時間と熱負荷による不活化は重要な過程であるため、ヒートブロックを用いて行わないでください。

⑦ 断片化が終了したら、1. 試薬の調製 (3)にしたがい、調製済み標識用ミックスを調製します。

⑧ 断片化用トレイをサーマルサイクラーから取り出し、増幅用ベースに置きます。

⑨ チューブのキャップを増幅産物のエアロゾルが発生しないよう慎重に外し、調製済み標識用ミックス 10μL を分注します。ピペッティングを3回繰り返してゆっくりと混和した後、新しいキャップを付けます。

⑩ 直ちに断片化用トレイ／Retainer を以下のとおりプログラムされた Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 にセットします。
プリサイクル　37℃で 35 分間
プリサイクル　95℃で5分間
プリサイクル　4℃でホールド
ユーザー名と Method 名を入力する。Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 の取扱説明書をご参照ください。METHOD プログラムを開始します。"Method Options"画面で"Ramp Speed"を"Max"、"Reaction Volume"を"34μL"にセットします。START を再度押します。プログラム終了まで約 45 分を要します。

⑪ 標識が終了したら、断片化用トレイをサーマルサイクラーから取り出し、増幅用ベースに置きます。ハイブリダイゼーションを行うまで、トレイを2～8℃で保存します(18 時間まで可能)。18 時間以内にハイブリダイゼーションを行わない場合、トレイは－20℃で保存してください。標識した断片化増幅産物は－20℃で1週間まで保存可能です。

(5) ハイブリダイゼーション

ヒートブロックを 95℃にセットし、氷冷浴を用意しておきます。

① 1.試薬の調製方法 (4)～(6)にしたがってハイブリダイゼーション緩衝液、染色試液及び洗浄液を調製します。

② 検体及びコントロールの数に応じた 1.5 mL チューブを用意し、試料番号を記載し、ハイブリダイゼーション緩衝液 500μL を各チューブに分注します。

③ 標識した断片化増幅産物をピペットにてよく混和後、対応する②のチューブに標識した断片化増幅産物 20μL を分注し、キャップをして試験管ミキサーを用いて 10 秒間混和します。標識した断片化増幅産物を－20℃保存した場合、室温で完全に融解してから使用してください。

④ ヒートブロックを用いて 95℃で 10 分間インキュベーションする。インキュベーション終了後、直ちにチューブを氷冷浴に入れます。

⑤ 検体及びコントロールの数に応じて別の 1.5 mL チューブを用意し、染色試液 500μL を分注します。

⑥ アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕を検体及びコントロールの数だけ用意します。

(6) GeneChip Fluidics Station の準備及び操作

機器の詳細な操作法、エラーメッセージ、ユーザー情報等については、GCOS 又は AMDS 用の各ユーザーズガイドを参照してください。

① ワークステーションのコンピュータにログインし、GCOS v1.1.3 以上又は AMDS v1.0 以上を立ち上げる。GeneChip Fluidics Station 450Dx のスイッチを入れます。

(7)ハイブリダイゼーション及び染色

① ハイブリダイゼーション緩衝液と変性した標識した断片化増幅産物を含むチューブを GeneChip Fluidics Station 450Dx の Position 1に、染色試液を含むチューブを GeneChip Fluidics Station 450Dx の Position 2に置きます。

② ハイブリダイゼーション及び染色が終了したら、Washblock door を閉じる前に GeneChip Fluidics Station からアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕を取り出します。アレイウインドーに気泡がないか目視確認します。気泡がある場合は、アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕を再度挿入し、washblock door を閉めます。GeneChip Fluidics Station 450Dx が自動的に洗浄液をアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕に満たします。詳細は機器

の取扱説明書に従ってください。

(8) アンプリチップ CYP450 マイクロアレイのスキャニング

① アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕から液漏れしないよう、Tough-Spots ラベルをアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕の背面の 2 つの Septa に貼り、穴が平らにふさがるように押します。

② アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕をGeneChip Scanner Autoloader に置きます。ハイブリダイゼーション及び染色したアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕を 30 分以内に GeneChip Scanner Autoloader にセットしない場合は、2～8℃で遮光保存してください。染色したアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕は2～8℃、暗所で1週間保存可能です。アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕のデータ解析は、ハイブリダイゼーションを操作するコンピュータ及びアンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕をスキャニングするコンピュータと同じコンピュータで行ってください。

③ 以下の操作により、アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕をスキャニングします。

GCOS v1.1.3 以上と AmpliChip CYP450_US Data Analaysis Software v2.1 を用いる場合

(a) GCOS v1. 1. 3 以上のユーザーインターフェース上でスキャニング機能を開始します。

(b) アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ 〔CYP450 Array〕 のスキャンが成功しない場合は、アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ〔CYP450 Array〕を拭いてから再度挿入し、"Allow rescans" のボックスを選択してから "OK" ボタンを押してスキャンを試みます。スキャンごとに別々の CEL ファイルが作成されます。

(c) 結果報告を見るために、以下のステップを順次踏みます。

ステップ1: AmpliChip CYP450_US Data Analaysis Software v2.1 を開きます。

ステップ2: CEL ファイルを選んでデータ解析を開始します。

ステップ3: 結果が表示されます。

各検体及びコントロールごとに結果とレポートファイルが作成されます。カスタマイズや結果の印刷などについては AmpliChip CYP450 Test Data Analysis Software の取扱説明書をご参照ください。

AMDS v1.0 以上と AmpliChip CYP450_US Data Analaysis Software v3.1 を用いる場合

(a) スキャニングを開始する前に、AmpliChip CYP450 Test Data Analaysis Software v3.1 以上内の Additional Information Window 又は Batch Information Window から結果が必要な項目(CYP2D6のみ、CYP2C19 のみ、CYP2D6と CYP2C19 の両方)を選択します。

(b) AMDS v1.0 以上のユーザーインターフェース上でスキャニング機能を開始します。

(c) スキャニング後、結果は自動的に Report 画面に表示されます。

各検体及びコントロールごとに結果とレポートファイルが作成されます。カスタマイズ や結果の印刷などについては AMDS の取扱説明書をご参照ください。

**【測定結果の判定法】

1. 結果の計算

アンプリチップ CYP450 のデータ解析ソフトでは、プローブセルの蛍光強度パターンを分析することで、特異的な多型サイトにおけるジェノタイプを決定します。その多型サイトにおけるジェノタイプを組み合わせにより、対応する CYP2D6及び CYP2C19 のアリルが同定されます。結果には、CYP2D6及び CYP2C19 遺伝子のジェノタイプと予測されるフェノタイプ(表現型)が報告されます。

2. 結果の表示

各コントロールについて以下の結果が得られた場合、測定は有効です。

コントロール	CYP2D6の結果	CYP2C19 の結果
アンプリチップ 陰性コントロール〔A-CHIP (-)C〕	No Call	No Call
アンプリチップ CYP450 陽性コントロール〔CYP450 (+)C〕	*4/*41	*1/*2

測定が無効である場合は全ての過程(増幅、断片化、標識、ハイブリダイゼーション及びスキャン)をやり直してください。

検体の結果は、Data Analysis Software により以下に示したアンプリチップ CYP450 で解析可能なアリルの変異型をもとに示されます。

アンプリチップ CYP450 で解析可能な CYP2D6アリル

多型の組み合わせから CYP2D6アリル遺伝子産物の酵素活性を予測することができます [6]。以下の表においては、アリルとして定義される塩基変化を太字で示しました。

アリル	塩基変化	予測される酵素活性	参 照
*1	なし	正常	Marez et al, 1997[7] Sachse et al, 1997[8] Kimura et al, 1989[9]
*2ABD	**-1584G**, 1039C>T, 1661G>C, **2850C>T**, **4180G>C**	正常	Johansson et al, 1993[10] Panserat et al, 1994[11] Raimundo et al, 2000[12] Marez et al, 1997[7] Sakuyama et al, 2008[59]
*3	**2549Adel**	活性なし	Kagimoto et al, 1990[13] Marez et al, 1997[7]
*4ABDJK	100C>T, 1039C>T, 1661G>C, **1846G>A**, 2850C>T, 4180G>C	活性なし	Sachse et al, 1997[8] Marez et al, 1997[7] Kagimoto et al, 1990[13] Gough et al, 1990[14] Hanioka et al, 1990[15]
*5	**CYP2D6遺伝子の欠損**	活性なし	Gaedigk et al, 1991[16] Steen et al, 1995[17]
*6ABC	**1707Tdel**, 1976G>A, 4180G>C	活性なし	Marez et al, 1997[7] Evert et al, 1994[18] Daly et al, 1995[19] Saxena et al, 1994[20]
*7	**2935A>C**	活性なし	Evert et al, 1994[18]
*8	1661G>C, **1758G>T**, 2850C>T, 4180G>C	活性なし	Broly et al, 1995[21]
*9	**2613-2615delAGA**	低下	Tyndale et al, 1991[22] Broly & Meyer, 1993[23]
*10AB	**100C>T**, 1039C>T, 1661G>C, 4180G>C	低下	Yokota et al, 1993[24] Johansson et al, 1994[25] Sakuyama et al, 2008[59]

アリル	塩基変化	予測される酵素活性	参　照
*11	883G>C, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	活性なし	Marez et al, 1995[26]
*15	138ins T	活性なし	Sachse et al, 1996[27]
*17	1023C>T, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	低下	Masimirembwa et al, 1996[28] Oscarson et al, 1997[29]
*19	1661G>C, 2539-2542delAACT, 2850C>T, 4180G>C	活性なし	Marez et al, 1997[7]
*20	1661G>C, 1973insG, 1978C>T, 1979T>C, 2850C>T, 4180G>C	活性なし	Marez-Allorge et al, 1999[30]
*29	1659G>A, 1661G>C, 2850C>T, 3183G>A, 4180G>C	低下	Marez et al, 1997[7] Wennerholm, et al. 2001[57] Wennerholm, et al. 2002[58]
*35	-1584G, 31G>A, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	正常	Marez et al, 1997[7] Gaedigk et al, 2003[55]
*36	100C>T, 1039C>T, 1661G>C, 4180G>C, エクソン9におけるCYP2D7への遺伝子変換	低下	Wang, 1992[31] Johansson et al, 1994[25] Leathart et al, 1998[32]
*40	1023C>T, 1661G>C, 1863ins(TTT CGC CCC)2; 2850C>T, 4180G>C	活性なし	Gaedigk et al, 2002[33]
*41	-1584C, 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	低下	Raimundo et al, 2000[12] Raimundo et al, 2004[34] Toscano et al, 2006[60] Rau et al, 2006[61]
*1XN	duplicate active *1 genes (n is not determined-range 2-13)	増加	Dahl et al, 1995[35] Sachse et al, 1997[8]
*2XN	duplicate active *2 genes (n is not determined-range2-13)	増加	Johansson et al, 1993[10] Dahl et al, 1995[35] Aklillu et al, 1996[62]
*4XN	duplicate inactive *4 genes (n is not determined)	活性なし	Lovlie et al, 1997[36] Sachse et al, 1998[37]
*10XN	duplicate partially active *10 genes (n is not determined)	低下	Garcia-Barcelo et al, 2000[38] Ji et al, 2002[39] Mitsunaga et al, 2002[40] Ishiguro et al, 2004[41]
*17XN	duplicate partially active *17 genes (n is not determined)	低下	Cai et al, 2006[42] Gaedigk et al, 2007[43]
*35XN	duplicate active *35 genes (n is not determined)	増加	Gaedigk et al, 2007[43]
*41XN	duplicate partially active *41 genes (n is not determined)	低下	Candiotti et al, 2005[44]

*検体が、表に示したアリルを保有していない場合、"No Call"もしくは、表に記載されているアリルに最も類似するアリルを表示します。

アリルの表、Site 及び Call のリストは Data Analysis Software により示されます。Site 及び Call のリストはヌクレオチド位置と塩基変化だけでなく多型 Call により定義された多型を示します。アリルの表、Site 及び Call のリストについては AmpliChip CYP450_US Data Analysis Software の取扱説明書をご参照ください。

WT	ホモ接合の野生型
HET	ヘテロ接合
MUT	ホモ接合の変異型
No Call	No call の場合
Positive	示された突然変異が存在する場合
Negative	示された突然変異が存在しない場合

予測される CYP450 2D6の代謝活性

2つのCYP2D6アリルによりコードされる酵素の活性の組み合わせは、個人の代謝活性全体を決定します。これらの組み合わせを以下の表に示します。代謝活性には4種のフェノタイプ（poor metaborizer、intermediate metabolizer、extensive metabolizer、ultrarapid metabolizers）があります。CYP2D6及び CYP2C19 遺伝子により示されるジェノタイプに基づいて予測されるフェノタイプは Data Analysis Software により示されます。

ア リ ル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	15	17	19	20	29	35	36	40	41	1XN	2XN	4XN	10XN	17XN	35XN	41XN
1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	U	U	E	E	E	U	E
2		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	U	U	E	E	E	U	E
3			P	P	P	P	P	P	I	I	P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
4				P	P	P	P	P	I	I	P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
5					P	P	P	P	I	I	P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
6						P	P	P	I	I	P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
7							P	P	I	I	P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
8								P	I	I	P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
9									I	I	I	I	I	I	I	I	E	I	I	I	E	E	I	I	I	E	I
10										I	I	I	I	I	I	I	E	I	I	I	E	E	I	I	I	E	I
11											P	P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
15												P	I	P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
17													I	I	I	I	E	I	I	I	E	E	I	I	I	E	I
19														P	P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
20															P	I	E	I	P	I	E	E	P	I	I	E	I
29																I	E	I	I	I	E	E	I	I	I	E	I
35																	E	E	E	E	U	U	E	E	E	U	E
36																		I	I	I	E	E	I	I	I	E	I
40																			P	I	E	E	P	I	I	E	I
41																				I	E	E	I	I	I	E	I

E：Extensive metabolizer
I：Intermediate metabolizer
P：Poor metabolizer
U：Ultrarapid metabolizer

アンプリチップ CYP450 で解析可能な CYP2C19 アリル

以下の表に示した典型的な多型の有無により CYP2C19 アリルが決定し、遺伝子産物の可能性のある酵素活性が予測されます[45]。アリルとして定義される塩基変化を太字で示しました。

アリル	塩基変化	予測される酵素活性	参照
*1	なし	正常	Romkes et al, 1991[46] Richardson et al, 1995[47] Blaisdell et al, 2002[48]
*2	**681G>A**	活性なし	de Morais et al, 1994[49] Ibeanu et al, 1998[50] Fukushima-Uesaka et al, 2005[63] Lee et al, 2009[64]
*3	**636G>A**	活性なし	de Morais et al, 1994[51] Fukushima-Uesaka et al, 2005[63]

予測される CYP450 2C19 の代謝活性

2つの CYP2C19 アリルによりコードされる酵素の活性の組み合わせは、個人の代謝活性全体を決定します。これらの組み合わせを以下の表に示します。代謝活性には2種のフェノタイプ（poor metaborizer、extensive metabolizer）があります。

アリル	1	2	3
1	E	E	E
2		P	P
3			P

E：Extensive metabolizer　　　　P：Poor metabolizer

アリル頻度の地理的分布

CYP2D6及び CYP2C19 遺伝子の多型性は地理的に異なった起源の人々の間では同等に分布されておらず、いくつかの多型とアリルは人種の分布と事実上同一です。白人の約7%は CYP2D6 poor metaborizer であるが、アジア人の約1～2%とアフリカ系アメリカ人の約2～4%のみが CYP2D6 poor metaborizer です[8), 52]。しかし、アジアにおける CYP2D6*10 アリル（アリルの頻度 50%）、アフリカ住民における CYP2D6*17 及び CYP2D6*29（各約 30%）といったような活性を低下させる数種のアリルが存在し、低い酵素活性により intermediate metabolizer を高い割合でもたらします。極度に低い活性や ultrarapid metabolizer のフェノタイプが個々の薬物の反応に最も大きく影響しますが、ある種の薬物では intermediate metabolizer で異なる反応を示します[53]。対照的に、エチオピア人の約29%、南ヨーロッパ人の約 10%及び北ヨーロッパ人の約1～2%は遺伝的に CYP2D6遺伝子重複による ultrarapid metabolizer です[52]。CYP2C19 の poor metabolizer の大多数は CYP2C19*2及び CYP2C19*3の 2 アリルにより説明できます。これらのアリルはいずれも単一ヌクレオチドの多型により起こり、スプライス部位の欠損又は停止コドンを引き起こします。これらのアリルはアジアでは人口の約 13～23%と一般的であり、フェノタイプとして poor metabolizer を示します。CYP2C19 の poor metabolizer は日本人では約 17%[56]、白人及びアフリカ系アメリカ人の約3～5%を占めます[54]。CYP2D6及び CYP2C19 アリルの頻度の推定を表5及び6に示します。また、日本人における CYP2C19 アリルの頻度の推定を表7に示します。

表5：地理的違いによる CYP2D6アリルの頻度[52]

アリル	予測される酵素活性	日本人	中国人	白人	黒人	アメリカインディアン	北アフリカ	西アフリカ
*1	正常	37%	28%	35%	25～42%	60%	12%	42%
*2	正常	16%	16%	29%	23～33%	20～33%	28%	12%
*3	なし	0%	0%	1%	＜1%	＜1%	0%	0%
*4	なし	＜1%	2～3%	17～19%	3～7%	3～11%	12%	6～7%
*5	なし	3～6%	5～6%	3%	6～7%	1～2%	3%	4～6%
*6	なし	0%	0%	＜1%	＜1%	0～3%	0%	0%
*9	低下	0%	0%	2～3%	＜1%	0%	0%	0%
*10	低下	38～40%	57%	3～5%	4～6%	3～6%	0%	4～5%
*17	低下	0%	0%	＜1%	12～21%	0～1%	8%	6～18%
*29	低下	0%	0%	＜1%	7%	0%	0%	9～12%
*41	低下	0%	2～4%	7～14%	3%	0%	8%	2～6%
*1XN	増加	＜1%	＜1%	＜1%	3%	2～3%	0%	0%
*2XN	増加	＜1%	＜1%	1～3%	2%	2～3%	28%	2～4%
*4XN	なし	0%	0%	＜1%	1～4%	＜1%	0%	7～14%
*10XN	低下	3%	1%	＜1%	0%	＜1%	0%	0%
*41XN	低下	0%	＜1%	＜1%	0%	0%	0%	0%

注：アリルの頻度の割合の幅は公表された研究結果を元に記載。

表6：地理的違いによる CYP2C19 アリルの頻度[54]

アリル	予測される酵素活性	中国	黒人	白人
*1	正常	58%	83%	86%
*2	なし	35%	16%	13%
*3	なし	7%	＜1%	＜1%

また、日本人における CYP2C19 アリルの頻度の推定を表7に示します。

表7：日本人における CYP2C19 アリルの頻度[56]

アリル	予測される酵素活性	日本人
*1	正常	58%
*2	なし	28%
*3	なし	14%

アンプリチップ CYP450 で解析不可能なアリル

以下に示したいくつかの CYP2D6及び CYP2C19 アリルについては、本品では解析できません。

CYP2C19：4～28

CYP2D6： 12～14、16、18、21～28、30～34、37～39、42～80

また、新しいアリルは現在の AmpliChip CYP450_US Data Analysis Software では正しく解析できません。

3. 結果の判定に関する注意

(1) 本キットはEDTA入り採血管で採取した全血検体のみ測定可能です。これ以外の検体を用いた場合、誤った測定結果を得るか、結果が得られないことがあります。

(2) 信頼のできる結果を得るには、適切な検体の採取、搬送、保存及び操作方法を行ってください。

測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果等と伴わせて担当医師が総合的に判断してください。

【臨床的意義】

解析したCYP2D6及びCYP2C19のジェノタイプに基づいて、CYP2D6及びCYP2C19の薬物代謝酵素活性を予測し、その予測結果に基づき薬物治療を行う際の補助として用いることができます。

【性能】

1. 性能

(1) 性能試験

試験対象となるキットを用いて、「アンプリチップ 陰性コントロール」及び「アンプリチップ CYP450 陽性コントロール」、ゲノムDNA試料「GM07439」及び「GM09912」についてそれぞれ2重測定し、それぞれの試料の結果がいずれも以下のとおりであることを確認します。

① アンプリチップ 陰性コントロール:CYP2D6及びCYP2C19のいずれもNo Callの結果を得ます。

② アンプリチップ CYP450 陽性コントロール:CYP2D6は*4/*41、CYP2C19は*1/*2の結果を得ます。

③ ゲノムDNA試料「GM07439」:CYP2D6は*4XN/*41、CYP2C19は*2/*2の結果を得ます。

④ ゲノムDNA試料「GM09912」:CYP2D6は*4/*5、CYP2C19は*1/*1の結果を得ます。

(2) 最小検出感度

CYP2D6:25 ng DNA

CYP2C19:2.5 ng DNA

2. 相関性試験成績

【操作上の注意】の項、「4. 反応特異性」に示した試料を用いて、本品の結果と、PCR-RFLP法(RFLP:Restriction Fragment Lenghth Polymorphism、制限酵素断片長多型測定)、AS-PCR法(Allele Specific PCR)とPCR-RFLP法を組み合わせた方法、DNA塩基配列決定法、DNA塩基配列決定法とAS-PCR法を組み合わせた方法のいずれかの結果を比較しました。その結果、他法との一致率はCYP2D6遺伝子99.1%(418/422)、CYP2C19遺伝子は100%(398/398)、でした(表8、9)。

表8 CYP2D6アリルの解析の比較

	試料数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	一致率
AS-PCR	301	299	0	2	99.3%
AS-PCRとPCR-RFLP	14	14	0	0	100.0%
PCR-RFLP	40	40	0	0	100.0%
DNA塩基配列決定	41	40	1	0	97.6%
DNA塩基配列決定とAS-PCR	21	21	0	0	100.0%
DNA塩基配列決定とPCR-RFLP	2	1	0	1	50.0%
PCRサイズのみ	3	3	0	0	100.0%
合計	422	418	1	3	99.1%

表9 CYP2C19アリルの解析の比較

	試料数	Correct Call 数	Miscall 数	No Call 数	一致率
PCR-RFLP	276	276	0	0	100.0%
DNA塩基配列決定とPCR-RFLP	122	122	0	0	100.0%
合計	398	398	0	0	100.0%

【使用上又は取り扱い上の注意】

1. 取り扱い上(危険防止)の注意

(1) 増幅反応の準備は、紫外線照射装置の装備されたクリーンベンチ内で行ってください。ピペットなどは常にこのクリーンベンチ内に置いてください。

(2) 増幅反応を準備するエリアには増幅後のDNAを持ち込まないでください。また、検体の分注には疎水性フィルター付きピペットと使い捨てチップを使用してください。

(3) 本キットを取り扱う時には使い捨てチップ及びピペットなどを使用し、微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。

(4) 検体及び本キットを取り扱う時には使い捨てゴム手袋、実験着、保護眼鏡を着用して操作してください。また、取り扱い後は手をよく洗ってください。

(5) 検体はHIV、HBV、HCVなどのウイルスによる感染の危険性があるものとして取り扱い、検体又は検査に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間以上加熱滅菌処理をするか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度5,000 ppm、0.5%)に1時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中は、じゅうぶんに換気を行ってください。

(6) ピペットは口で吸わないでください。

(7) 検体及び本キットを取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。

(8) キットの試薬を取り扱う際には保護眼鏡、実験着及び使い捨てゴム手袋を着用し、試薬が皮膚、目、粘膜などに触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合は、大量の水でじゅうぶんに洗い流し、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。

(9) 試薬をこぼした場合には、水でよく希釈してから拭き取ってください。

2. 使用上の注意

(1) ロットの異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないでください。

(2) ロット又は同一ロットでバイアルの異なるコントロールを混ぜ合わせて使用しないでください。

(3) 期限切れの試薬は使用しないでください。判定結果の信頼性を保証しかねます。

(4) すべての構成試薬は2~8 ℃で保存してください。これらの構成試薬は開封後2~8℃で6ヵ月間(有効期間内)まで保存可能です。

(5) アンプリチップ CYP450 マイクロアレイはプラスチック製カートリッジ上の正方形のガラス製マイクロアレイです。ガラス表面の傷や汚れは誤測定の原因となります。指で直接ガラスを触らないでください。また、ローション、インクや綿くずは蛍光を発します。ガラス表面が明らかに汚れている場合は、精製水を用いて慎重に洗浄してください。

(6) 洗浄液は調製後15~30℃で保存してください。また、20 mmol/L EDTA溶液及びハイブリダイゼーション緩衝液は調製後2~8℃で保存してください。染色試液は2~8℃で遮光保存してください。10% Triton X-100溶液は15~30℃で遮光保存してください。これらの試薬は調製後6ヵ月まで保存可能です。

3. 廃棄上の注意

(1) 使用後の容器を廃棄する場合には廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。

(2) ピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃などを徹底してください。

(3) 検体を取り扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて 121° C で 20 分間加熱して滅菌するか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に1時間以上浸すなどにより消毒した後廃棄してください。これらの作業中には、じゅうぶんに換気を行ってください。

(4) アンプリチップ CYP450 マスターミックス、アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A、アンプリチップ CYP450 プライマーミックス B、アンプリチップ マグネシウム試液、アンプリチップ B1 オリゴヌクレオチド試液、アンプリチップ CYP450 陽性コントロール、アンプリチップ 陰性コントロール、5% アジ化ナトリウム、ハイブリダイゼーション緩衝液、染色液及び洗浄液はアジ化ナトリウムを含んでいます。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性の金属アジドを生成するので、これらの試薬を廃棄する際には大量の水で洗い流してください。

(5) 遺伝子検査後の核酸試料及び増幅された DNA の廃棄は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に混和後一晩放置するなど、DNA を破壊してから廃棄してください。

(6) DNA を扱ったピペットチップ及びプラスチック容器などは、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に一晩浸すなどにより DNA を破壊してから、焼却処理又は密閉できるビニール袋を2重に施し、医療廃棄物として処理してください。

(7) DNA 試料を含む溶液は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に混和後一晩放置するなど、DNA を破壊してから、各都道府県によって定められた規定に従って廃液処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

2~8℃で保存

2. 有効期間

構成試薬の有効期間

アンプリチップ CYP450 マスターミックス	15 ヵ月
アンプリチップ CYP450 プライマーミックス A	15 ヵ月
アンプリチップ CYP450 プライマーミックス B	15 ヵ月
アンプリチップ マグネシウム試液	12 ヵ月
アンプリチップ TdT 標識試液	16 ヵ月
アンプリチップ B1 オリゴヌクレオチド試液	12 ヵ月
アンプリチップ CYP450 マイクロアレイ	12 ヵ月
アンプリチップ CYP450 陽性コントロール	12 ヵ月
アンプリチップ 陰性コントロール	12 ヵ月

キットの有効期限

各ロットに含まれる各構成試薬の有効期限のうち、最短のものをキットの有効期限とします。

【包装単位】

アンプリチップ CYP450 24 テスト

(各構成試薬の詳細につきましては、【形状・構造等(キットの構成)】を参照してください)

**【主要文献】

1) Fodor, S.P.A. et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Scinece. 1991, 251, p.767~773.
2) Pease, A.C. et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proceedings of theNational Academy of Scineces U.S.A. 1994, 91, p.5,022~5,026.
3) http://www.imm.ki.se/CYPalleles
4) Longo, M.C. et al. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990, 93, p.125~128.
5) Kunitz, M. Spectrophhtometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. Jounal of General Physiology. 1950, 33, p.349~362.
6) http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm
7) Marez, D. et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. Pharmacogenetics. 1997, 7, p.193~202.
8) Sachse, C. et al. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. American Journal of Human Genetics. 1997, 60, p.284~295.
9) Kimura, S. et al. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. American Journal of Human Genetics. 1989, 45, p.889~904.
10) Johansson, I. et al. Inherited amplify-cation of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 1993, 90, p.11,825~11,829.
11) Panserat, S. et al. DNA haplotype-dependent differnves in the amino acid sequence of debrisoqine 4-hydroxylate (CYP2D6): evidenvce for two major allozymes in extensive metabolisers. Human Genetics. 1994, 94, p.401~406.
12) Raimudo, S. et al. Elucidation of the genetic basis of the common ‘intermediate metabolizer’ phenotype for drug oxidation by CYP2D6, Pharmacogenetics. 2000, 10, p.577~581.
13) Kagimoto, M. et al. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of devrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. Journal of Biological Chemistry. 1990, 265, p.17,209~17,214.
14) Gough, A.C. et al. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. Nature. 1990. 347, p.773~776.
15) Hanioka, N. et al. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934→A base change in itron 3 of a mutant CYP2D allele results in an aberrant 3’ splice recognition site. American Journal of Human Genetics. 1990, 47, p.994~1,001.
16) Gaedigk, A. et al. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. American Journal of Human Genetics. 1991, 48, p.943~950.
17) Steen, V.M. et al. Homologuous unequal cross-over involving a 2.8kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. Human Molecular Genetics. 1995, 4, p.2,251~2,257.
18) Evert, B. et al. Clonng and sequencing of a new non-functional CYP2D6 allele: deletion of T1795 in exon 3 generates a premature stop codon. Pharmacogenetics. 1994, 4, p.271~274.
19) Daly, A.K. et al. AN inactive cytochrome P450 CYP2D6 allele containing a deletion and a base substitution. Human Molecular Genetics. 1995, 95, p.337~341.

20) Saxena R. et al. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. Human Molecular Genetics. 1994, 3, p.923～926.
21) Broly, F. et al. A nonsense mutation in the cytochrome P450 CYP2D6 gene identified in a Caucasian with an enzyme deficiency. Human Genetics. 1995, 96, p.601～603.
22) Tyndale, R. et al. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. Pharmacogenetics. 1991, 1, p.26～32.
23) Broly F. et al. Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base- pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. Pharmacogenetics. 1993, 3, p.123～130.
24) Yokota H. et al. Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J I a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism. Pharmacogenetics. 1993, 3, p.256～263.
25) Johansson I. et al. Genetics analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of cariant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. Molecular Pharmacology. 1994, 46, p.452～459.
26) Marez, D. et al. A novel CYP2D6 allele with an abolished splice recognition site associated with the poor metabolizer phenotype. Pharmacogenetics. 1995, 5, p.305～311.
27) Sachse, C. et al. A rare insertion of T226 in exon 1 of CYP2D6causes a fragmeshift and is associated with the poor metabolizer phenotype: CYP2D6*15. Pharmacogenetics. 1996, 6, p.269～272.
28) Masimirembwa, C. et al. A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6*17) common in a bloack African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. British Journal of Clinical Pharmacology. 1996, 42, p.713～719.
29) Oscarson, M. et al. A combination of mutations in the CYO2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. Molecular Pharmacology. 1997, 52, p.1,034～1,040.
30) Marez-Allorge, D. et al. A rare G2061 insertion affecting the open reading frame of CYP2D6 and responsible for the poor metabolizer phenotype. Pharmacogenetics. 1999, 9, p.393～396.
31) Wang, S. Phenotypes and genotypes of debrisoquine hydroxylation polymorphisms in Chinese, Master's thesis. National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan. 1992.
32) Leathart, J.B. et al. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. Pharmacogenetics. 1998, 8, p.529～541.
33) Gaedigk, A. et al. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype doscprdamce in back Americans. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2002, 72, p.76～89.
34) Raimundo, S. et al. A novel intronic mutaion, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. Clinical Pharmacology and Therapuetics. 2004, 76, p.128～138.
35) Dahl, M.L. et al. Ultrarapid hydroxylation of debisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutis. 1995, 274, p.516～520.
36) Lovile, R. et al. Characterization of the 16+9 kb and 30+9 kb CYP2D6 Xbal haplotypes. Pharmacogenetics. 1997, 7, p.149～152.
37) Sachse, C. et al. Correctness of prediction of the CYP2D6 gene phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. Pharmacogenetics. 1998, 8, p.181～185.
38) Garcia-Barcelo, M. et al. Occurrence of CYP2D6 gene duplication in Hong Kong Chinese. Clinical Chemistry. 2000, 46, p.1,411～1,413.
39) Ji, L. Pan, S. et al. Single-step assays to analyze CYP2D6 gene polymorphisms in Asians: allele frequencies and a novel *14B allele in mainland Chinese. Clinical Chemistry. 2002, 48, p.983～988.
40) Mitsunaga, Y. et al. Frequent occurrence of CYP2D6*10 duplication allele in a Japanese population. Mutation Research. 2002, 505, p.83～85.
41) Ishiguro, A. et al. Metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in healthy Japanese volunteers carrying duplicated CYP2D6 genes: duplicated allele of CYP2D6*10 does not increase CYP2D6 metabolic activity. Clinica Chimica Acta. 2004, 344, p.201～204.
42) Cai, W. et al. CYP2D6, genetic variation in healthy adults and psychiatric African-American subjects: Implicati ons for clinical practice and genetic testing. The Pharmacogenomics Journal. 2006, 1, p.1～8.
43) Gaedigk, A. et al. Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: Characterization of gene duplica tion events. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2007, 81, p.242～251.
44) Candiotti, K. et al. The impact of Pharmacogenomics on Postoperative Nausea and Vomiting: Do CYP2D6 Allele Copy Number and Polymorphism Affect the Success or Failure of Ondansetron Prophylaxis? Anesthesiology. 2005, 102, p.543～549.
45) http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c19.htm
46) Romkes, M. et al. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. Biochemistry. 1991, 30, p.3,247～3255.
47) Richardson, T.H. et al. A universal approach to the expression of human and rabbit cytochrome P450s of the 2C subfamily in Escherichia coli. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1995, 323, p.87～96.
48) Blaisdell, J. et al. Identification and functional characterization of new poetentially defective alleles of human CYP2C19. Pharmacogenetics. 2002, 12, p.703～711.
49) de Morais, S. M. et al. The majour genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. Journal of Biological Chemistry. 1994, 269, p.15,419～15,422.
50) Ibeanu, G.C. et al. Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C9*6 and CYP2C19*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1998, 286, P.1,490-1,495.
51) De Morais, S.M. et al. Identificaiton of a new getic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. Molecular Pharmacology. 1994, 46, p.594～598.
52) Bradford, L.D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. Pharmacogenomics. 2002, 3, p.229～243.
53) Furman, K.D. et al. Impact of CYP2D6 intermediate metabolizer alleles on single-dose desipramine pharmacokinetics. Pharmacogenetics. 2004, 14, p.279～284.
54) Goldstein, J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. British Journal of Clinical Pharmacology. 2001, 52, p.349～355.
55) Gaedigk, A. et al. CYP2D6 poor metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the -1584G promoter polymorphism. Clinical Chemistry. 2003, 49, p.1,008～1,011.
56) Yasui, F. et al. Association Between Cytochrome P450 (CYP) 2C19 Polymorphisms and Harm Avoidance in Japanese. American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Geneitics). 2007, 144B, p.724～727.
57) Wennerholm, A. et al. Characterization of the CYP2D6*29 allele commonly present in a block Tanzanian population causing reduced catalytic activity. Pharmacoggenetics. 2001, 11, p.417～427.
58) Wennerholm, A. et al. The African-specific CYP2D6*17 allele encodes an enzyme with changed substrate specificity. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2002, 1, p.77～88.

59) Sakuyama, K. et al.　Functional Characterization of 17 CYP2D6 Allelic Variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55 and 57).　Drug Metabolism and Disposition.　2008, 36, p.2,460～2,467.
60) Toscano, C. et al.　Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metaboilzers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: evidence for modulation of splicing events.　Pharmacogenetics and Genomics.　2006, 16, p.755～766.
61) Rau, T. et al.　The 2988G>A polymorphism affects splicing of a CYP2D6 minigene.　Clinical Pharmacology and Therapeutics.　2006, 80, p.555～558.
62) Aklillu, E. et al.　Frequent Distribution of Ultrarapid Metabolizers of Debrisoquine in an Ethiopian Population Carrying Duplicated and Multiduplicated Functional CYP2D6 Alleles.　Journal of Pharmacol and Exper Thera.　1996, 278, p.441～446.
63) Fukushima-Uesaka. et al.　Genetic Variations and Haplotypes of CYP2C19 in a Japanese Population.　Drug M etab Pharmacokinetics.　2005, 20, p.300～307.
64) Lee, S-J. et al.　Identification of New CYP2C19 Variants Exhibiting Decreased Enzyme Activity in the Metabol ism of S-Mephenytoin and Omeprazole.　Drug Metab and Disposition.　2009, 37, p.2,262～2,269.

【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
カスタマーサポートセンター
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
フリーダイヤル：0120-600-152

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
フリーダイヤル：0120-600-152

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

® 登録商標

0 5233496 001-D